

機関番号：32644

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～2010

課題番号：20500343

研究課題名 (和文) スフィンゴ脂質による神経機能制御機構の解明

研究課題名 (英文) Function of sphingolipid in the nervous system

研究代表者

松田 純子 (MATSUDA JUNKO)

東海大学・糖鎖科学研究所・准教授

研究者番号：60363149

研究成果の概要 (和文) : スフィンゴ脂質のセラミド部分の多様性が、細胞の膜機能をどのように制御しているのかを解明するために、セラミドのスフィンゴ塩基部分の C-4 位を水酸化するジヒドロセラミド: スフィンガニン C-4-水酸化酵素 (DES2) のノックアウトマウス (*Des2-KO*) を作成し、その表現型を解析した。*Des2-KO* は消化管、腎臓でフィトスフィンゴ脂質を欠損し、消化管上皮細胞、尿細管上皮細胞において病理組織変化を呈した。神経系では、一部の *Des2-KO* に脳海馬体の歯状回最内層に神経細胞死を認めた。野生型マウス脳のガングリオリドに微量成分としてフィトセラミド骨格を持つ分子種が同定された。以上の結果よりスフィンゴ脂質のセラミド部分の多様性は上皮細胞や神経細胞の形態や機能の維持に必要であることが示された。

研究成果の概要 (英文) : Glycosphingolipids are ubiquitous eukaryotic membrane lipids with highly diverse structures with hundreds of head-groups attached to various ceramides. Structure of ceramide varies due to various alkyl chain length, hydroxylation, and desaturation in both the sphingoid base and the *N*-acyl chain. Dihydroceramide: sphinganine C-4 hydroxylase (DES2) introduces the hydroxyl group at C-4 of sphinganine to produce phytoceramide. In mammals, phytoglycosphingolipids (phytoGSLs) expressed in the small intestinal epithelial cells, renal tubular epithelial cells and skin keratinocytes. To investigate the physiological role of phytoGSLs, *Des2* null mice (*Des2*^{-/-}) were generated by gene targeting. By the thin-layer chromatography coupled to mass spectrometry, *Des2*^{-/-} lacked phytoGSLs in small intestine and kidney, proving that DES2 is responsible for their biosynthesis. *Des2*^{-/-} were born healthy, but about 50% of *Des2*^{-/-} began to show growth retardation at around 10 days of age and were subsequently died at around 2-3 weeks of age. However, the other half of the *Des2*^{-/-} survived up to 20 months. *Des2*^{-/-} showed the histopathological changes in the small intestinal epithelial cells and renal tubular epithelial cells. In the nervous system, some of the *Des2*^{-/-} displayed neuronal cell death in the dentate gyrus of the hippocampus. Gangliosides with the phytoceramide structures were detected as minor species in the cerebrum of wild type mice. These findings of *Des2*^{-/-} suggest us a critical role of phytoGSLs in the epithelial cells and neurons as membrane-specific lipid components.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脂質生化学・神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：スフィンゴ脂質、海馬、小腸上皮、尿細管上皮、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質は、疎水基としてセラミドを持つ生体膜の重要な脂質成分で、シグナル認識・伝達にかかわる生体超分子構造「ミクロドメイン」の形成に関与する。スフィンゴ脂質には、その糖鎖部分、脂肪酸部分、スフィンゴ塩基部分の構造の違いによって数千種類もの多様な分子種が知られており、その分布には組織・領域・細胞別に特異性がある。

脳・神経系は、他の組織に比べ、多彩で豊富なスフィンゴ脂質を含み、各分子種の分布には、発生段階別・領域別・細胞別に際立った特異性がある。中枢神経系におけるスフィンゴ脂質の量的質的变化は個体レベルで神経機能に大きな影響を及ぼす。例えば、スフィンゴ脂質のライソゾームにおける分解異常であるスフィンゴリポドーシス（脂質蓄積症）では、ヒト、モデルマウスともに、多くの場合が中枢神経症状を示す。これらの事実は、スフィンゴ脂質の多様性が神経機能の発現に重要であることを示唆する。しかしながら、これらスフィンゴ脂質の多様性がどのような分子メカニズムで神経機能を制御しているのか、その具体的な関係は大部分が不明である。

スフィンゴ脂質のセラミド部分の構造決定には ジヒドロセラミド： Δ -4-不飽和化酵素(DES1)、ジヒドロセラミド：スフィンガニン C-4-水酸化酵素(DES2)および脂肪酸-2-水酸化酵素(FA2H)が関与することが明らかになっている。DES2はスフィンガニンの4位の炭素を水酸化する酵素で、*in vitro*ではこの活性によりスフィンゴ脂質の親水性部分に近い疎水性部位に水酸基を1個多く持つフィトスフィンゴ脂質が合成される。連携研究者である鈴木らは、フィトスフィンゴ脂質の生物学的機能と、その合成酵素であるDES2の生化学的、分子生物学的解析を行ってきた (Omae F. et al. *Biochem J.* 379:687-695, 2004., Omae F. et al. *FEBS Lett.* 576:63-67, 2004., Enomoto A. et al. *Biochem. J.* 379:289-295, 2006)。フィトスフィンゴ脂質は、哺乳動物の生体内で微量成分であるが、小腸微絨毛膜、腎臓尿細管上皮頂端側、皮膚などに組織特異的に豊富に存在することから、膜を介した物質輸送への関与など、その生物学的機能が推定されているものの直接的な証明はなされていない (Suzuki A. et al. *J. Biochem.* 90:1541-1544, 1981)。

我々は、2002年にDES2がクローニングされたのを受け、マウス組織におけるDES2の発現解析を行った。その結果、DES2は成体マウスにおいて小腸に最も多く、次いで腎臓に多いことが明らかになった。この結果はフィトスフィンゴ脂質の分布と一致し、マウス組織において、DES2の作用によってフィトスフィンゴ脂質が作られることを示唆する

ものであった。DES2の免疫組織染色法による発現解析では、小腸上皮において、幹細胞が存在する陰窩(Crypt)に強く発現していた。胎仔マウス組織では小腸、腎臓で成体に比し多く発現し、成体では極わずかししか発現を認めない脳においても小腸と同等に発現していることを見出した。これらの結果から、DES2およびその産物であるフィトスフィンゴ脂質が小腸、腎臓、脳において重要な生理機能を担っている可能性が示唆された。そこで、我々は個体レベルでフィトスフィンゴ脂質の生理機能を明らかにするために、DES2ノックアウトマウス(Des2-KO)を作成した。

2. 研究の目的

本研究課題では、スフィンゴ脂質のセラミド部分の多様性が細胞の膜機能をどのように制御しているのか、Des2-KOの表現型解析を通して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Des2-KO組織における脂質組成の変化を、特にスフィンゴ脂質のセラミド骨格の構造変化に着目して解析した。クロロホルム/メタノール(1/2:v/v)で各組織から脂質を抽出後、ヘキサン/メタノール(1/1:v/v)で遊離脂肪酸を除き、アルカリ処理してグリセロ脂質を除いた。これを中和した後、C18逆層カラムを用いて酸性脂質と中性脂質に分離、精製した。酸性脂質、中性脂質をそれぞれ薄層クロマトグラフィー(HPTLC)により展開、分離し、Des2-KOと野生型マウス(WT)で比較した。さらに各バンドを掻き出し、再抽出した後、質量分析計(MALDI-QIT-TOF-MS)を用いて構造を推定した。脳神経系組織では、大脳の主要なガングリオシドGM1、GD1a、GD1b、GT1b、GQ1bのセラミド骨格の構造をLC-IT-MSで解析した。

(2) Des2-KOの表現型を、臨床症状、体重増加率、尿血液検査、組織病理検査などを用いて解析した。

(3) フィトスフィンゴ脂質の欠損により発現変化を受ける膜タンパク(チャンネル、トランスporterなど)をDNAマイクロアレイ法によりスクリーニングした。小腸上皮および腎臓尿細管上皮の頂端側での発現が知られている各種チャンネル、トランスporterの発現を免疫学的手法により検討した。また、小腸および脳における発達段階別のDes1、Des2、Fa2hの発現変化をreal-time PCR法で検討した。

(4) Des2-KO由来の小腸上皮細胞および神経細胞を初代培養し、その動態を検討した。

4. 研究成果

(1) 腎臓の中性脂質のHPTLC分析で、Des2-KOではWTに比しヘキサシルセラミド

(HexCer)、ラクトシルセラミド(LacCer)、グロボトリアオシルセラミド(Gb3)のバンドに一部欠損が認められた。質量分析の結果、欠損するバンドはいずれも t18:0 のスフィンゴシン塩基からなるフィトスフィンゴ脂質で、Des2-KO に存在するバンドは d18:1 からなる分子種のみであった。消化管の中性脂質の HPTLC 分析では、小腸および大腸において、HexCer、triHexCer、アジアロ GM1(GA1)、フコシル GA1 のバンドの移動度に差を認めた。質量分析の結果、WT のこれらのバンドはいずれも大部分が t18:0 からなるフィトスフィンゴ脂質であったのに対し、Des2-KO では大部分が d18:0 および d18:1 からなる分子種であった。これらの結果より、Des2-KO では腎臓および消化管において大部分のフィトスフィンゴ脂質が欠損しており、マウスでは DES2 がフィトスフィンゴ脂質の合成にかかわる主たる酵素であることが明らかになった。脳では、HPTLC 分析では WT と Des2-KO 間に明らかな違いは認められなかったが、LC-IT-MS によるガングリオシドの構造解析で、WT の大脳において、GD1 に、既知の d18:1-18:0、d20:1-18:0 の他にフィトセラミド骨格 (t18:0-18:0)を持つものが検出された。今後は t18:0 のセラミドを含むガングリオシドの脳組織内での局在を解析すると共に、Des2-KO で欠損することを確認する必要がある。

(2) Des2-KO の表現型解析では、Des2-KO には生後 10 日頃より発育不良を呈し、2 週間前後で死亡する早期死亡群と寿命が 1 年以上の軽症群の大きく 2 つ異なる表現型が観察された。軽症群の尿血液検査では、尿浸透圧の低下、血清浸透圧の上昇を認めた。Des2-KO の小腸においては、小腸上皮微絨毛の低形成を認め、小腸上皮の頂端側膜を構成する主要なフィトスフィンゴ脂質である GA1 が頂端側膜に局在せず、細胞内に異常な局在を示すことが抗 GA1 抗体を用いた免疫組織染色法で明らかになった。腎臓においては、集合管の拡張が見出され、一部の個体において水腎症様の形態変化を認めた。早期死亡群の神経系では、脳海馬体の歯状回最内層に細胞死の増加が見出され、一部の個体において脳室の拡大が認められた。これらの結果は従来、微量成分であるためほとんど注目されてこなかったフィトスフィンゴ脂質が、個体の生理機能、特に小腸、腎臓尿管のみならず脳神経系においてもその機能維持に重要であることを示唆する。一方、Des2-KO の表現型の不均一性がマウスの遺伝的背景の違いによるのか否か、遺伝子破壊に用いた挿入遺伝子のエピジェネティックな影響によるのかなどを考慮したさらなる表現型解析が必要である。

(3) フィトスフィンゴ脂質は、小腸、腎臓、

皮膚組織に特異的に存在しており、上皮細胞の膜脂質として膜機能への関与が推測されている。そこで、小腸上皮細胞に発現する膜タンパク質の Des2-KO における発現変化を検討した。Des2-KO と同胞の WT の小腸組織からマイクロソーム画分を調整し、ウェスタンブロット解析で各種膜タンパク質 (グルコーストランスポーター(GLUT5)、ナトリウム・グルコーストランスポーター(SGLT1)、ペプチドトランスポーター(PEPT1)、アルカリホスファターゼ(ALP)、ジペプチジルペプチダーゼ(DPPIV)、低比重リポタンパク質受容体(LDLR)) の発現量を検討した。また、免疫組織染色法で小腸組織における膜タンパク質の局在を検討した。ウェスタンブロット解析の結果、頂端膜に局在する ALP と DPPIV、基底側面膜に局在する LDLR において特異的なバンドが検出され、その発現量は WT と Des2-KO の間に有意差を認めなかった。小腸組織の免疫組織染色の結果、ALP は WT では小腸上皮細胞の頂端膜に局在し、絨毛の陰窩部近傍から先端まで均一に局在していたが、Des2-KO では陰窩部近傍の発現が低下していた。LDLR は WT では基底側面膜に局在していたが、Des2-KO では核近傍に局在していた。Des2-KO の小腸上皮細胞では、膜タンパク質の局在に変化がある可能性が示されたことは、膜脂質であるフィトスフィンゴ脂質が小腸上皮細胞における膜タンパク質の適切な局在化に必要であることを示唆する。

マウス小腸と脳における Des1、Des2、Fa2h の mRNA の発現量の発達変化を real-time RT-PCR 法で経時的(日齢 3, 10, 20, 60) に調べたところ、小腸では Des1 が日齢 10 に比し日齢 20、60 で有意に低く、Des2 は日齢 3 から同レベルの発現が認められた。Fa2h は予想外にいずれの日齢においても検出されなかった。この結果は、小腸のスフィンゴ脂質の大部分がヒドロキシ脂肪酸からなるとするスフィンゴ脂質の構造解析の結果と相反しており、小腸のスフィンゴ脂質の脂肪酸部の水酸化には FA2H とは別の酵素が関わっている可能性が示唆された。一方、脳においては、Des1 は日齢 3 から同レベルの発現が認められ、Des2 は日齢 10 に比し日齢 20、60 で有意に高い発現が認められた。この結果は、DES2 の代謝産物であるフィトスフィンゴ脂質が脳において重要な生理機能を担っている可能性を示唆した。Fa2h は既報のとおり、髄鞘化の進行と相関して、日齢 20 をピークとする発現変化を示した。

4) Des2-KO 胎仔 (E15.5-16.5) 由来の小腸を用いて小腸上皮細胞の初代培養系を確立した。アクチンを可視化するファロイジンと抗 GA1 抗体を用いた検討で、WT では上皮細胞

の特徴である、細胞の極性が維持されたが、*Des2-KO* では、*GA1* の膜への局在が不明瞭になっている様子が観察された。神経細胞の初代培養系は現在確立を試みている。

我々は、本研究課題において、セラミドのスフィンゴ塩基部分の C-4 位に水酸基を 1 個多く持つフィトスフィンゴ脂質の生合成に関わる *DES2* を破壊したマウス (*Des2-KO*) の表現型を解析し、*Des2-KO* はフィトスフィンゴ脂質を欠損していることを見出した。これにより、*DES2* がフィトスフィンゴ脂質の合成にかかわる主たる酵素であることが明らかになった。*Des2-KO* はフィトスフィンゴ脂質が多く存在する消化管上皮細胞、尿管上皮細胞において病理組織変化を呈することが明らかになり、スフィンゴ脂質のセラミド部分の多様性が上皮細胞の形態や機能の維持に必要であることが示唆された。神経系の表現型に関しては、一部の *Des2-KO* に脳海馬体の歯状回最内層に神経細胞死を認めたが現時点では表現型が不均一で、今後の検討が必要と考えられるが、脳のガングリオンに微量成分としてフィトセラミド骨格を持つ分子種が同定されており、フィトセラミドの欠損による神経病理変化である可能性は十分あると考えている。海馬体の歯状回最内層は生後も新生能を持つ神経幹細胞が存在する領域であることから、フィトスフィンゴ脂質の神経幹細胞の増殖能、新生能への関与の可能性も推定できる。今後、*Des2-KO* の表現型解析をさらに進め、スフィンゴ脂質の多様性と生物機能、特に膜機能との関係を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1) Miyazaki M, Yoneshige A, Matsuda J, Kuroda Y, Kojima N, Suzuki A. HPTLC-MS for rapid analysis of neutral glycosphingolipids. *J AOAC Int.* 91: 1218-1226, 2008. (査読有)

2) Yoneshige A, Suzuki K, Kojima N, Matsuda J. Regional expression of prosaposin in the wild-type and saposin D-deficient mouse brain detected by an anti-mouse prosaposin-specific antibody. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B.* 85: 422-434, 2009. (査読有)

3) Yoneshige A, Sasaki A, Miyazaki M, Kojima N, Suzuki A, Matsuda J. Developmental changes in glycolipids and synchronized expression of

nutrient transporters in the mouse small intestine. *J. Nutr. Biochem.* 21: 214-226, 2010. (査読有)

4) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, Matsuda J. A Mutation in the Saposin C Domain of the Sphingolipid Activator Protein (Prosaposin) Gene Causes Neurodegenerative Disease in Mice. *J. Neurosci. Res.* 88: 2118-2134, 2010. (査読有)

5) Hojo H, Katayama H, Tano C, Nakahara Y, Yoneshige A, Matsuda J, Sohma Y, Kiso Y, Nakahara Y.: Synthesis of the sphingolipid activator protein, saposin C, using an azido-protected O-acyl isopeptide as an aggregation- disrupting element. *Tetrahedron Lett.* 52: 635-639, 2011. (査読有)

6) 松田純子: サポシン欠損と神経機能障害. 脳 21「特集;糖鎖と神経疾患 糖脂質」金芳堂. 14: 55-60, 2011. (査読無)

[学会発表] (計 22 件)

1) 松田純子、米重あづさ、鈴木明身: 新生仔マウス小腸におけるスフィンゴ糖脂質組成の発達変化: トランスポーターの発現変化との関係. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸、開催年月日: 2008 年 12 月 9-12 日.

2) 米重あづさ、松田純子: サポシンC欠損マウスは神経変性疾患を発症する. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸、2008 年 12 月 9-12 日.

3) 松田純子、米重あづさ、佐々木彩乃: サポシンC欠損マウスは神経変性疾患を発症する. 第 50 回日本先天代謝異常学会米子市 (鳥取県)、2008 年 11 月 15-17 日.

4) Hojo H, Katayama H, Onuma Y, Nakahara Y, Yoneshige A, Matsuda J, Nakahara Y.: Synthetic Study of Sphingolipid Activator Glycoprotein, Saposin C. 第 46 回ペプチド討論会 福岡 2009 年 11 月.

5) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, and Matsuda J.: Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. 第 3 回国際ライソゾーム病シンポジウム 名古屋 2009 年 10 月.

6) Matsuda J, Yoneshige A, Suzuki A. Role of hydroxylation at sphinganine C-4 of glycosphingolipids in the mouse. 第 82 回日本生化学会大会 神戸 2009 年 10 月.

7) 米重あづさ、渡辺 昂、松田純子: サポシンC欠損 $twit$ cherマウスは重症化する. 第 82 回日本生化学会大会 神戸 2009 年 10 月.

8) 渡辺 昂、米重あづさ、鈴木明身、松田純子: ジヒドロセラミド:スフィンガニン C4-水酸化酵素(DES2)ノックアウトマウスは腎臓および消化管のフィトスフィンゴ脂質を欠く. 第 82 回日本生化学会大会 神戸 2009 年 10 月.

9) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, and Matsuda J: Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. Neuroscience 2009 Chicago, USA. October 17-21, 2009.

10) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, and Matsuda J: Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry. Busan, Korea. August, 2009.

11) 松田純子, 武藤真長, 米重あづさ, 渡辺 昂: マウス胚発生におけるプロサポシンの役割. 第 52 回日本先天代謝異常学会大阪, 2010 年 10 月.

12) 米重あづさ, 渡辺 昂, 武藤真長, 松田純子: サポシンC欠損 $twit$ cherマウスにおける領域特異的な神経細胞死の解析. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 神戸, 2010 年 12 月.

13) 渡辺 昂, 米重あづさ, 武藤真長, 鈴木明身, 松田純子: マウス消化管におけるスフィンゴ糖脂質のセラミド構造の発現制御. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸, 2010 年 12 月.

14) 武藤真長, 米重あづさ, 渡辺 昂, 松田純子: マウス胚発生におけるプロサポシンの役割. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸, 2010 年 12 月.

15) 立花徳啓, 松田純子, 八巻 聡, 鈴木明身: 微量成分セラミドのマウス大脳ガングリオシド構造解析. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸, 2010 年 12 月.

16) 松田純子, 米重あづさ, 武藤真長, 渡辺

昂: クラッペ病モデルマウスにおけるラクトシルセラミドの蓄積と神経細胞死. 第 15 回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 2010 年 12 月.

17) 松田純子: ラクトシルセラミドの蓄積と神経細胞死. 第 8 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム. 東京・品川, 2010 年 12 月.

18) Yoneshige A, Matsuda J: Deficiency of saposin C in the mouse model of Krabbe disease showed neurodegeneration with accumulation of lactosylceramide. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010). Makuhari, Japan, August, 2010.

19) Watanabe T, Yoneshige A, Suzuki A, Matsuda J: The differential ceramide structures of glycosphingolipids and their regulations in the mouse gastrointestinal tract The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010). Makuhari, Japan, August, 2010.

20) Mutou M, Yoneshige A, Matsuda J: Lack of prosaposin in mice causes embryonic lethal phenotype and placental dysgenesis. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010). Makuhari, Japan, August, 2010.

21) Matsuda J, Yoneshige A: The role of sphingolipid activator protein, saposins A-D in the nervous system: lessons learnt from mouse models of specific saposin deficiencies. Naito conference: Glycan Expression and Regulation [I]: Functions and Disease mechanisms. Kanagawa, Japan, August, 2010.

22) Yoneshige A, Watanabe T, Suzuki A, Matsuda J: The differential ceramide structures of glycosphingolipids and their regulations in the mouse gastrointestinal tract. Naito conference: Glycan Expression and Regulation [I]: Functions and Disease mechanisms. Kanagawa, Japan, August, 2010.

〔図書〕(計 3 件)

1) Matsuda J: Sphingolipid activator proteins. In Experimental Glycoscience: glycobiology, edited by Taniguchi, N. et al. pp 125-129, Springer, Japan, 2008.

2) 松田純子: サポシン欠損症. ライソゾーム病—最新の病態、診断、治療の進歩. 診断と治療社. 2011 (印刷中).

3) 松田純子: シアリドーシス. ライソゾーム病—最新の病態、診断、治療の進歩. 診断と治療社. 2011 (印刷中).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 純子 (MATSUDA JUNKO)
東海大学・糖鎖科学研究所・准教授
研究者番号：60363149

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

鈴木 明身 (SUZUKI AKEMI)
東海大学・糖鎖科学研究所・教授
研究者番号：70134533